双拷贝 *APP/BACE/DPsn* 转基因果蝇模型的建立及基因功能的研究

刘 宁，张 儒*
（同济大学生命科学与技术学院受体生物医药实验室，上海市信号转导与疾病研究重点实验室，上海 200092）

摘要：阿尔茨海默症（Alzheimer's disease，AD），是一种以脑中 β-淀粉样蛋白（β-amyloid peptide，Aβ）沉积为主要病理改变的神经退行性疾病。在果蝇 *Drosophila* 模型中建立淀粉样蛋白前体蛋白（amyloid precursor protein，APP）的剪切通路模拟 Aβ 的产生过程，有望建立一种快速筛选治疗 AD 药物的动物模型。我们利用经典的 *Gal4/UAS* 系统，将现有的 *APP/BACE/DPsn* 果蝇品系连续杂交，通过同源重组的方法构建表达两个拷贝的 *APP/BACE/DPsn* 稳定可遗传的转基因果蝇新品系。进一步的实验结果表明：与不表达 *APP/BACE/DPsn* 的对照果蝇 *w/y*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 相比，表达两拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的 *w/y*；*elav-APP*；*BACE-DPsn* 果蝇的最长寿命为 52 d，比对照组（69 d）缩短了 17 d，为对照组果蝇的 75%；中位生存时间为 39 d，比对照组（49 d）缩短了 10 d，为对照组的 80%；平均寿命为 37 d，比对照组（47 d）缩短了 10 d，为对照组的 79%。同时，表达两个拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇所产卵的羽化时间比对照果蝇延长了 3 d；其羽化成虫的理论值为 1:9（11%），而实际羽化率仅为 5.2%。结果提示，由 elav-Gal 驱动在果蝇泛神经元内过表达 *APP/BACE/DPsn*，可以缩短果蝇寿命、干扰果蝇胚胎正常发育。该果蝇有可能作为初步筛选 AD 治疗药物的动物模型，为 AD 治疗新药的发现提供工具。

关键词：转基因果蝇；*APP* 基因；*BACE* 基因；*DPsn* 基因；阿尔茨海默症
中图分类号：Q963 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2011)10-1087-07

Construction and functional study of a transgenic *Drosophila* model with two copies of *APP/BACE/DPsn* genes

LIU Ning, ZHANG Ru* (Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, Laboratory of Receptor-based Bio-medicine, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a kind of cognitive dysfunction disease and β-amyloid (Aβ) generation is crucial for AD pathogenesis and plays a key role in disease progression. A transgenic fly expressing two copies of *APP/BACE/DPsn* to mimic the pathologic changes of AD might be useful for AD therapeutic drug screening. Using the classic *Gal4/UAS* system, we constructed the stable transgenic flies expressing two copies of *APP/BACE/DPsn* genes by consecutive crosses and homologus recombination. Further tests revealed that the lifespan and the medium survival time of flies expressing two copies of *APP/BACE/DPsn* genes were 52 d and 39 d, respectively, which were much shorter than the lifespan of 69 d and the medium survival time of 49 d of the control flies. Furthermore, the eclosion time of the flies expressing two copies of *APP/BACE/DPsn* genes was 3 d longer than that of the control flies, and the eclosion rate was 5.2% which was much less than the theoretical value 1∶9 (11%). The results suggest that the elav-Gal driven neuronal expression of two copies of *APP/BACE/DPsn* genes in flies leads to shorter lifespan and decreases viability of the offspring. These phenotypes of the transgenic fly might be used as a preliminary drug screen model for AD therapy.

Key words: Transgenic *Drosophila*; *APP*; *BACE*; *DPsn*; Alzheimer's disease

阿尔茨海默症（Alzheimer's disease，AD），又称老年性痴呆，是一种以进行性、不可逆性的认知和记忆能力的衰退为主要表现的神经退行性疾病。AD 患者的特征性病理标志为：淀粉样蛋白（β-

基金项目：科技部科研项目（2008DFB30150）；上海市科委科研项目（08431910100；09DZ2260100）
作者简介：刘宁，女，1986 年 4 月生，山东临沂人，硕士研究生，主要从事动物遗传学研究，E-mail：sunliuning2005@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ru.zhang@tongji.edu.cn
收稿日期 Received：2011-04-28；接受日期 Accepted：2011-09-16

amyloid peptide, Aβ)聚积于胞外形成的老年斑和神经元内 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结(Selkoe, 2001)。国外报道 65 岁以上的老年人群 AD 患病率为 5% ~10%。AD 在全球的发病率呈逐年上升的趋势, 据国际老年痴呆协会(ADI)的统计, 全世界目前有 2 400 多万人正在遭受这种疾病的折磨, 据预测, 到 2040 年, AD 患者人数将以每 20 年翻一倍的速度增长(吴晋等, 2006; Reitz *et al.*, 2011)。

AD 病因十分复杂, 可能与老龄化、遗传及环境等因素相关(Migliore and Coppedè, 2009)。Aβ 级联假说是目前研究 AD 发病机制的重点, Aβ 是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)在 β-分泌酶 BACE(beta-site APP cleaving enzyme)和 γ-分泌酶的水解下产生的短肽, 在 AD 的发病进程中发挥了重要作用(Esch *et al.*, 1990; Hardy and Selkoe, 2002; Walsh and Selkoe, 2007)。

传统的研究神经退行性疾病的模型主要局限于啮齿类的小鼠和大鼠。如今, 果蝇 *Drosophila* 以其独特的分子遗传学优势和清晰的遗传背景的优点越来越多地被用于在体内研究神经退行性变疾病的模型(温艾和刘力, 2003)。Greeve 等(2004)通过在果蝇体内模拟 APP 剪切通路来研究 AD, 利用经典的遗传杂交实验技术和果蝇特有的 *Gal4/UAS* (Brand and Perrimon, 1993)系统, 构建了 *Gmr-Gal4* (果蝇眼睛组织), *Act-Gal4*(全身组织)驱动表达 *UAS-APP*, *UAS-BACE*, *UAS-DPsn* 的转基因果蝇体系, 研究 AD 病变过程。在我们的前期研究中, *elav/(w)y*; *APP/+*; *BACE406/+*(X 染色体 elav-Gal4 驱动一拷贝水平泛神经元表达 APP/BACE)果蝇表型不明显。为了建立表型明显的转基因果蝇品系用于 AD 治疗药物的筛选, 本研究探讨了泛神经元表达两拷贝水平的 *APP/BACE-DPsnL235P* 对果蝇的表型特征的影响。我们利用果蝇经典的 *Gal4/UAS* 系统, 通过连续杂交和分子表型的筛选, 建立了在果蝇泛神经元中表达两拷贝 *APP/BACE-DPsn* 的体系, 并通过蛋白印迹杂交实验, PCR 法对构建的模型进行鉴定; 以成虫的寿命、子代的羽化时间和数量等表型作为观察指标, 初步评价该果蝇是否可以作为 AD 治疗药物的筛选动物模型。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系

本研究所用果蝇均为黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, 5 个品系分别为 *w*; *elav-Gal4*, *w*; *APP/Cyo*; *BACE-DPsn/TM6BTb*, *w*; *Sco/Cyo*, *w*; +; *TM3Sb/TM6BTb*, *w*; *Sp/Cyo*; *BACE-DPsn/TM6BTb* 和 w^{1118}, 均来自于同济大学受体生物医药实验室和分子遗传学实验室。果蝇培养环境条件: 温度为 25 ±0.5℃, 相对湿度为 75%±5%, 自然光照周期。

1.2 试剂

基础培养基: 1 000 mL 水, 65 g 蔗糖, 85 g 玉米粉, 7.5 g 琼脂, 7.5 g 酵母, 5 mL 丙酸; 扩增培养基: 1 500 mL 水, 112.5 g 蔗糖, 130 g 玉米粉, 16 g 琼脂, 27 g 酵母, 10%(溶剂 95% 乙醇)对羟基苯甲酸甲酯 2.3 g。

Taq DNA 聚合酶、PCR 缓冲液、$MgCl_2$ 和 dNTP 均购自上海天根公司, 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 兔抗 APP 抗体购自 Sigma 公司。

人源 *APP/BACE* 基因的引物序列见表 1。

表 1 人源 *APP/BACE* 基因的 PCR 鉴定引物序列
Table 1 Primer sequences for human *APP* and *BACE* gene characterization

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence
APP	$APPI_F$	CGCAGACGCTCAACATCCTG
	$APPI_R$	CGGGCCCGATCAAAGACAA
	$APPII_F$	GAGATGGTGGACAACCTGAGGG
	$APPII_R$	CTGCCTTGATGGATTTGACTGC
BACE	BACE I_F	GATGCCCTTCTCGTTCCTGAC
	BACE I_R	CTCGTTGGCTGCTTCCTGTT
	BACE II_F	AGGATGACTCGGATGTCTGGTG
	BACE II_R	CCTGGAAATGCTGGATAACTGC

1.3 *w*; *elav-APP/Cyo*; *BACE-DPsn/TM6BTb* 转基因果蝇的构建

1.3.1 制备 F1 代果蝇: 将 *Gal4*(*elavII*)品系果蝇与 *w/y*; *APP/Cyo*; *BACE-DPsn/TM6BTb* 品系果蝇杂交, 分离 F1 代雌性果蝇, 2 号染色体为 *APP/elav*, 3 号染色体为 *+/TM6BTb*。

1.3.2 制备 F2 代果蝇: 将 1.3.1 步骤中获得的 F1 代雌果蝇 *w*; *APP/elav*; *+/TM6BTb* 与 *w/y*; *Sco/Cyo* 品系雄果蝇杂交, 雌性 F1 代果蝇 2 号染色体上会发生一定比例的基因重组, 分离 F2 代果蝇, 挑选一对深眼色、2 号染色体发生重组的 *elav-APP/Cyo*, 卷翅的果蝇进行扩增, 通过检测 APP 的表达, 鉴定是否发生基因重组。

将 *w/y*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 品系果蝇与 *w*；+/+；*TM6BTb/TM3Sb* 品系果蝇杂交，分离 F2 代果蝇，该 F2 代果蝇的 2 号染色体为 +/*Cyo*，3 号染色体为 *BACE-DPsn/TM6BTb*。

1.3.3 制备 F3 代果蝇：将 1.3.2 步骤中获得的 F2 代果蝇 *w/y*；*elav-APP/Cyo* 与 *w*；+/*Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 品系果蝇杂交，分离 F3 代果蝇，F3 代果蝇的 2 号染色体为 *elav-APP/*+，3 号染色体为 *BACE-DPsn/*+。

1.3.4 制备 F4 代果蝇：将 1.3.3 步骤中获得的 F3 代果蝇 *w*；*elav-APP/*+；*BACE-DPsn/*+ 与 *w/y*；*Sp/Cyo*；*TM3Sb/TM6BTb* 品系果蝇杂交，分离 F4 代果蝇，F4 代果蝇的 2 号染色体为 *elav-APP/Cyo*，3 号染色体为 *BACE-DPsn/TM6BTb*。

1.4 蛋白质免疫印迹

提取果蝇的脑组织样品，10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳（点样量 25 μg）后，转移至 PVDF 膜，封闭液（5% 脱脂奶粉）室温封闭 1 h。兔抗 APP 一抗（1/5 000稀释于 TBST）4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次，HRP 标记的抗兔抗体（1/5 000 稀释于 TBST）室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次，加入 Amersham ECL Plus 进行化学发光检测。

1.5 转基因果蝇的 PCR 鉴定

分别收集 ecs（*elav/Y*；+/+），APP/BACE406（*w/Y*；*APP/APP*；*BACE406/BACE406*），e406（*elav/Y*；*APP/*+；*BACE406/*+）及 *w/*（*Y*）；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 的果蝇头部各 30 头，提取各个样品的基因组 DNA。PCR 反应体系：10 × PCR 缓冲液 1 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 1 μL，10 mmol/L dNTP 1 μL，引物 1 μL，DNA 模板 1 μL，10 mmol/L Taq DNA 聚合酶 1 μL，加水补足到 20 μL。

PCR 反应条件：94℃初始变性 5 min，94℃变性 30 s，60℃复性 30 s，72℃扩增 30 s，30 个循环后 72℃延伸 5 min。将所有 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，用凝胶成像与分析系统观察并分析电泳结果。

1.6 果蝇寿命测定

选择基因型为 *w*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 处女蝇用作母本和 *w/y*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 的雄蝇作父本；选择基因型为 *w*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 处女蝇用做母本和 *w/y*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 的雄蝇作父本，收集 8 h 内羽化的未交配的果蝇，根据果蝇所带的分子标记挑出目的基因型：*w/y*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*，*w/y*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*，*w/y*；*elav-APP*；*BACE-DPsn*，每瓶随机挑选 20 头果蝇分装至相应的培养瓶中，设平行实验 4 组。每隔 3 d 更换一次普通培养基，每天统计死亡果蝇数目，直至果蝇全部死亡。

1.7 果蝇羽化率的记录

选择基因型为 *w*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 处女蝇用作母本和 *w/y*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 的雄蝇作父本；选择基因型为 *w*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 处女蝇用作母本和 *w/y*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 的雄蝇作父本，每个杂交瓶中放入父母本 5 对。待 7 d 后将亲本倒空，记录每支管子中下一代自第 1 头成虫孵出后 6 d 内的成虫数。

1.8 数据统计与分析

利用统计学软件 Graphpad Prism 5.0 将观察记录的结果生成果蝇发育曲线和寿命曲线。

2 结果与分析

2.1 转基因果蝇品系建立的过程

果蝇平衡染色体的存在使果蝇与其他生物在遗传学上有所不同，具有清晰可识别的显性标记，会产生不同的表现型，利于子代的选育。在没有选择的情况下将以杂合子形式持续遗传给后代，并且在遗传过程中染色体不发生交换。果蝇组织特异性表达模式 *Gal4-UAS* 系统被用来构建表达 AD 相关的 *APP/BACE/DPsn* 转基因模型，elav-Gal4^{c155} 为泛神经表达的启动子，启动产生 Gal4 转录因子，随后结合到上游激活序列（upstream activating sequence，UAS）上启动 *UAS-APP/UAS-BACE-DPsn* 的表达。

为构建表达两个拷贝水平的 *APP/BACE/DPsn* 的转基因果蝇品系，设计了如图 1 所示的杂交方案，根据交配方案挑选所需的基因型，连续进行杂交，获得了稳定可遗传的转基因果蝇 *w/*（*Y*）；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*。

2.2 转基因果蝇的鉴定

2.2.1 转基因果蝇的体色筛选及基因型的确立：由于 *Gal4*（*elavII*）品系果蝇身体呈黄色，控制体色的基因为隐性遗传，所以在最后得到的 F4 代果蝇中，控制体色的基因出现了分离，因此后代中有黑体色果蝇和黄体色果蝇，需要对 *w/*（*Y*）；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 进行体色纯化，筛选具有黑体基因的纯合子的表型进行保种，最终获得 a，

$\frac{w}{w(Y)}$; $\frac{elav\text{-}Gal4}{elav\text{-}Gal4}$; $\frac{+}{+}$ x $\frac{w}{w(Y)}$; $\frac{APP}{Cyo}$; $\frac{BACE\text{-}DPsn}{TM6BTb}$

F1 $\frac{w}{w}$; $\frac{APP}{elav}$; $\frac{+}{TM6BTb}$ x $\frac{w}{Y}$; $\frac{Sco}{Cyo}$; $\frac{+}{+}$ $\frac{w}{w(Y)}$; $\frac{APP}{Cyo}$; $\frac{BACE\text{-}DPsn}{TM6BTb}$ x $\frac{w}{w(Y)}$; $\frac{+}{+}$; $\frac{TMSb}{TM6BTb}$

F2 [$\frac{w}{Y}$; $\frac{elav\text{-}APP}{Cyo}$; $\frac{+}{+}$] x $\frac{w}{w}$; $\frac{+}{Cyo}$; $\frac{BACE\text{-}DPsn}{TM6BTb}$

F3 $\frac{w}{w(Y)}$; $\frac{elav\text{-}APP}{+}$; $\frac{BACE\text{-}DPsn}{+}$ x $\frac{w}{w(Y)}$; $\frac{Sp}{Cyo}$; $\frac{BACE\text{-}DPsn}{TM6BTb}$

F4 $\frac{w}{w(Y)}$; $\frac{elav\text{-}APP}{Cyo}$; $\frac{BACE\text{-}DPsn}{TM6BTb}$

图 1 *APP/BACE/DPsn* 转基因果蝇的构建策略

Fig. 1 Construction strategy of the *APP/BACE/DPsn* transgenic *Drosophila*

引入平衡子用以构建转基因果蝇品系；*elav-Gal4* 和 *UAS-APP* 基因同时插入到同一条 2 号染色体上的果蝇(框中所示)是通过同源重组的方式获得。The balancers were introduced to construct the transgenic line. Flies with *elav-Gal4* and *UAS-APP* genes co-inserted in chromosome 2 (highlighted in a box) were obtained via homologous recombination.

b 和 c 3 个品系基因型用于后续实验，各基因型果蝇特征如图 2(A)所示，(a) *w*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 为不表达 *APP/BACE/DPsn* 的对照果蝇；(b)*w*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 果蝇表达一个拷贝的 *APP/BACE/DPsn*；(c)*w*；*elav-APP*；*BACE-DPsn* 果蝇表达两个拷贝的 *APP/BACE/DPsn*。

我们进一步对通过杂交最终获得的果蝇品系 *w/(Y)*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 进行了 PCR 鉴定，如图 2(D)所示，PCR 扩增检测结果表明，同阴性对照样品相比，以杂交获得的果蝇 DNA 为模板扩增出人源 *APP* 基因的目的片段(765 和 582 bp)和人源 *BACE* 基因的目的片段(970 和 678 bp)，证实我们挑选获得的果蝇品系为 *w/(Y)*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*。

2.2.2 *elav-APP/Cyo*；+/+果蝇的鉴定：在图 1 的第 2 步杂交过程中，母本果蝇 *w*；*APP/elav*；+/*TM6BTb* 产生配子时可能发生染色体的交叉互换，与父本果蝇 *w/y*；*Sco/Cyo*；+/+交配后会出现表型为卷翅的重组型后代 *elav-APP/Cyo*；+/+和亲本型后代 *elav/Cyo*；+/+和 *APP/Cyo*；+/+。重组后代较亲本型眼色更红，子代中雄蝇较雌蝇眼色更容易区别重组型和亲本型，因而，通过子代雄蝇眼色的比较可以挑选出重组型后代 *elav-APP/Cyo*；+/+(图 2：B)。

通过上述眼色分析初步挑选发生了基因重组的果蝇 *elav-APP/Cyo*；+/+，我们进一步通过蛋白质免疫印迹法检测该果蝇有无 APP 蛋白的表达。如图 2(C)所示，与转染 *pcDNA3.0-APP-HA* 质粒的 HEK293 细胞裂解液(样品 1)类似，初步筛选的发生重组的 *elav-APP/Cyo*；+/+果蝇的脑组织样品中(样品 3)有人源 APP 蛋白的表达，且同时检测到了该人源蛋白在果蝇中的同源蛋白 APPL；而不表达人源 APP 的 *APP/Cyo*；+/+果蝇脑组织样品中(样品 2)仅检测到了果蝇内源性 APPL 蛋白的表达。此结果进一步确证了 *elav/APP* 基因重组到同一条染色体上，并分配到后代，elav-Gal4 启动了 APP 在该果蝇后代的脑神经元中的表达。

2.3 泛神经元表达两拷贝 *APP/BACE-DPsn* 缩短果蝇寿命

果蝇寿命是用果蝇这种模式动物进行研究时最易获得的检测指标，也是衡量果蝇基本生理状况的常用指标，可以作为利用果蝇进行特定疾病治疗药物筛选时的初筛指标。为了观察我们新建立的果蝇品系是否在寿命上有所改变，我们对不表达或表达单拷贝或两拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇寿命进行了比较(图 3)。对照组果蝇 *w/y*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 不表达 *APP/BACE*，该果蝇的最长寿命为 69 d，中位生存时间为 49 d，平均寿命为 47 d。很有意思的是，表达一拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的 *w/y*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb* 果蝇最长寿命为 81 d，与对照组相比，延长了 12 d，为正常对照的 120%；中位生存时间为 55 d，与对照组相比，延长了 6 d，为对照组的 110%；平均寿命为 54 d，与对照组相比，延长了 7 d，为对照组的 115%，这一

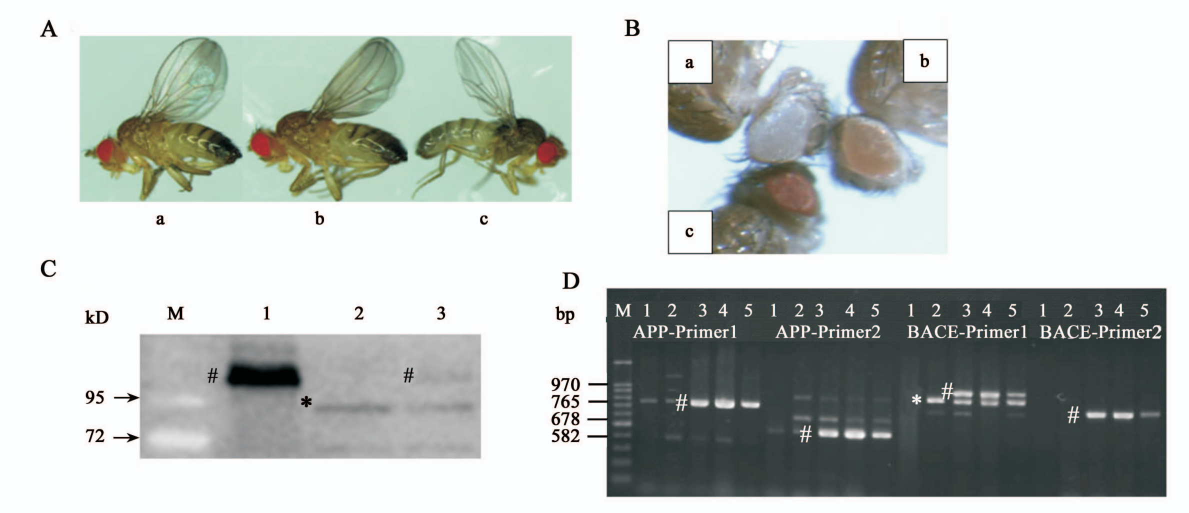


图 2　*APP/BACE/DPsn* 转基因果蝇的鉴定

Fig. 2　Identification of the *APP/BACE/DPsn* transgenic *Drosophila*

A：*APP/BACE/DPsn* 转基因果蝇的体色筛选 The body color selection of *APP/BACE/DPsn* transgenic *Drosophila*. a：*w/Y*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*（对照组果蝇品系）*w/Y*；*APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*（control line）；b：*w/Y*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*（表达一拷贝 *APP/BACE/DPsn*）*w/Y*；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*（expressing one copy of *APP/BACE/DPsn*）；c：*w/Y*；*elav-APP*；*BACE-DPsn*（表达两拷贝 *APP/BACE/DPsn*）*w/Y*；*elav-APP*；*BACE-DPsn*（expressing two copies of *APP/BACE/DPsn*）. B：通过眼色表型区别果蝇重组型 *w/Y*；*elav-APP/Cyo*；+/+（c）和亲本型果蝇 *w/Y*；*elav/Cyo*；+/+（a），*w/w*（*Y*）；*APP/Cyo*；+/+（b）Distinguish the recombinant gene type *w/Y*；*elav-APP/Cyo*；+/+（c）and parental type *w/Y*；*elav/Cyo*；+/+（a），*w/w*（*Y*）；*APP/Cyo*；+/+（b）according to the eye color phenotype. a，b，c：*w*；*elav /APP*；+/*TM6BTb* 和 *w/Y*；*Sco/Cyo*；+/+杂交后代中卷翅、无 Tb 表型的果蝇 All curlyo，no Tb flies obtained by the cross of *w*；*elav / APP*；+/*TM6BTb* and *w/Y*；*Sco/Cyo*；+/+. C：通过蛋白印迹杂交实验检测重组型果蝇 *w/Y*；*elav/Cyo*；+/+（泳道 2），*w/w*（*Y*）；*elav-APP/Cyo*；+/+（泳道 3）中 APP 蛋白的表达 Detection of the APP protein in gene recombinant *Drosophila w/Y*；*elav/Cyo*；+/+（lane 2），*w/w*（*Y*）；*elav-APP/Cyo*；+/+（lane 3）via Western blotting. #：约 100 kD 的 APP 蛋白条带（果蝇内源性 APPL 作为内参，以 * 表示）；泳道 1 为外源表达的人源 APP 蛋白的 HEK293 细胞裂解液. The APP protein band at 100 kD [*Drosophila* endogeneous APPL（*）as the control]；protein lysate of human APP expressed in HEK293 cells（lane 1）. D：PCR 鉴定转基因果蝇 *elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*，扩增的 *APP/BACE* 基因条带以# 标记，非特异性条带以 * 标记 PCR analysis of transgenic *Drosophila elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*. Amplified *APP/BACE* fragment is marked by # and none-specific fragment by *. 1：无模板对照 No template control；2：ecs 果蝇 *ecs*（*elav/Y*；+/+）；3：APP/BACE406 系（*w/Y*；*APP/APP*；*BACE406/BACE406*）；4：e406（*elav/Y*；*APP/*+；*BACE406/*+）；5：*w/*（*Y*）；*elav-APP/Cyo*；*BACE-DPsn/TM6BTb*.

现象与我们的前期实验所见表达一拷贝 *APP/BACE* 的 *w/y*；*APP/elav*；*BACE/*+果蝇寿命长于其对照果蝇 *w/y*；+/*elav*；+/+相一致（未发表数据）。而表达两拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的 *w/y*；*elav-APP*；*BACE-DPsn* 果蝇的最长寿命为 52 d，与对照组相比，缩短了 17 d，为对照组果蝇的 75%；中位生存时间为 39 d，比对照组缩短了 10 d，为对照组的 80%；平均寿命为 37 d，比对照组缩短了 10 d，为对照组的 79%（表 2）。

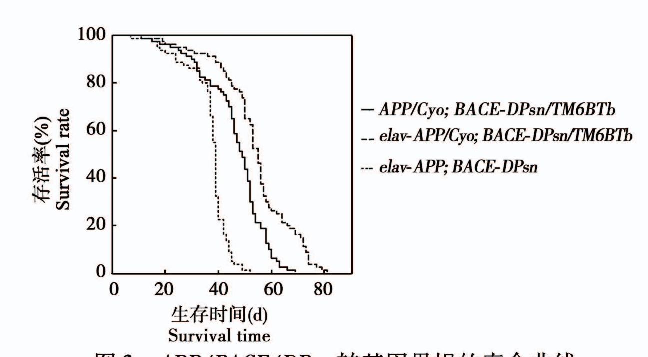


图 3　*APP/BACE/DPsn* 转基因果蝇的寿命曲线

Fig. 3　Life span curve of the *APP/BACE/DPsn* transgenic *Drosophila*

实线代表对照组果蝇，表达一拷贝的 *APP/BACE/DPsn* 和表达两拷贝的 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇品系分别用虚线和点划线表示，与对照组果蝇品系比较寿命曲线差异显著（$P < 0.0001$）. Real line represents control line. Line expressing one copy and two copies of *APP/BACE/DPsn* are denoted in dashed line and dotted line，respectively. Life span curves of both lines expressing *APP/BACE/DPsn* are significantly different from that of control line（$P < 0.0001$）.

2.4　*APP/BACE/DPsn* 的过表达抑制果蝇早期胚胎发育

与果蝇寿命相似，果蝇早期胚胎发育是另一个容易获得并且可以用于药物筛选的初筛指标。*APP/BACE/DPsn* 的过表达是否可以干扰果蝇早期胚胎发育尚无明确报道。我们比较了表达不同拷贝数的 *APP/BACE/DPsn* 果蝇群体后代与不表达 *APP/BACE* 的对照组果蝇的群体后代，观察上述果

表 2 *APP/BACE/DPsn* 的过表达对果蝇寿命的影响

Table 2 Effects of overexpression of *APP/BACE/DPsn* on longevity of *Drosophila*

基因型 Genotype	最长寿命(d) Life span	中位生存时间(d) Medium survival time	平均寿命(d) Average life span
APP/Cyo; *BACE-DPsn/TM6BTb*	69	49	47
elav-APP/Cyo; *BACE-DPsn/TM6BTb*	81	55	54
elav-APP/Cyo; *BACE-DPsn*	52	39	37

蝇后代的羽化时间及羽化出成虫的个体数。结果如图 4 所示，与对照果蝇 *w/(Y)*; *APP/Cyo*; *BACE-DPsn/TM6BTb* 相比，表达一个拷贝 *APP/BACE/DPsn* 果蝇 *w/w(Y)*; *elav-APP/Cyo*; *BACE-DPsn/TM6BTb* 所产卵的羽化时间延长了 2 d，而表达两个拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇 *w/y*; *elav-APP*; *BACE-DPsn* 所产卵的羽化时间延长了 3 d；并且表达一拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇的羽化成虫的理论值为 4∶9(44%)，表达两拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇的羽化成虫的理论值为 1∶9(11%)，而两者实际羽化比率分别为 37.4% 和 5.2%。

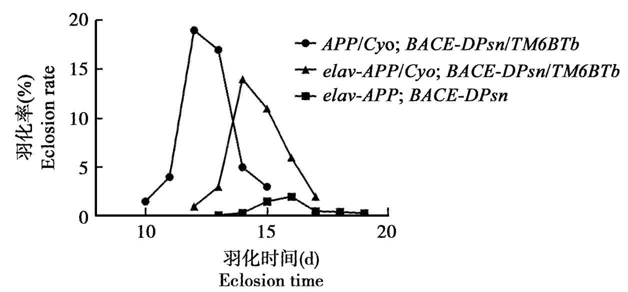


图 4 *APP/BACE/DPsn* 的过表达对果蝇羽化能力的影响

Fig. 4 Effects of overexpression of *APP/BACE/DPsn* in *Drosophila* on eclosion activity

圆圈代表不表达 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇；三角形和正方形分别代表表达一拷贝和两拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇. Circle represents flies without expressing *APP/BACE/DPsn*; triangle and square denote one copy and two copies of *APP/BACE/DPsn* flies, respectively.

3 讨论

果蝇是研究高级神经活动过程中遗传和细胞生物学通路的一个重要模型，和其他传统的转基因动物模型相比具备以下优势：(1)生命周期短；(2)饲养成本低廉；(3)繁殖能力强，可通过遗传杂交获得大量子代；(4)遗传背景清晰，共有 4 对染色体，还有许多携带便于遗传操作的表型标记(万永奇和谢维，2006)。果蝇作为模式生物最大的优势就在于可以模拟疾病发生过程，由于果蝇具有复杂的神经系统与脑组织，但阻止药物到达中枢神经系统的屏障很弱，便于进行治疗疾病的药物的大规模筛选(Bilen and Bonini, 2005)。同时，在果蝇发育的任何阶段比如受精卵、胚胎的各个时期或者成虫时期都可在果蝇培养基中使用候选药物，以单剂量浓度或者多剂量浓度梯度测试药效均可。因此这一模型对 AD 的研究很有益处，潜力巨大。

果蝇的神经退行性疾病模型与人类神经退行性疾病有很多相似的表型，如疾病的进程性和神经系统的高毒性(Fortini and Bonini, 2000；武永生，2008)。人们已经用果蝇建立起了多种人类神经退行性疾病模型，并已经取得了显著的研究进展(Lu and Vogel, 2009)，比如利用转基因果蝇模型研究 APP 剪切途径的最终产物 Aβ 的毒性作用(Iijima *et al.*, 2004, 2008)。本研究建立了稳定可遗传表达两个拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇模型，该模型模拟哺乳动物 AD 疾病中的病理通路，即在其泛神经元内过表达足够量的 APP/BACE/DPsn 从而模拟人类 APP 剪切途径，elav-Gal 驱动的 *APP/BACE/DPsn* 的过表达导致 APP 在 β 及 γ 分泌酶的顺序剪切后产生 Aβ 在神经系统堆积，从而模拟 AD 样病理改变。通过对所建立的果蝇进行寿命和羽化率的检测，我们发现表达两个拷贝 *APP/BACE/DPsn* 的果蝇寿命明显缩短。很有意思的是，在我们前期实验中发现转基因果蝇 *elav/Y*; *APP/+*; *BACE406/+* 尽管具备了 APP 剪切通路，但缺乏能体现 AD 进程的明显表型，无法使用该模型进行 AD 治疗药物的筛选，这一现象与我们本研究中获得的表达一拷贝 *APP/BACE/DPsn* 基因的 *w/y*; *elav-APP/Cyo*; *BACE-DPsn/TM6BTb* 果蝇表现类似，该果蝇与对照果蝇相比反而表现为寿命延长。早期研究发现 APP 的生理功能不仅局限于被分泌酶剪切产生 Aβ，它可能作为细胞表面受体介导细胞黏附(Breen *et al.*, 1991)、促进神经元突触生长(Milward *et al.*, 1992)、促进细胞增殖(Saitoh *et al.*, 1989)及神经保护作用(Mattson *et al.*, 1993；Schubert and Behl, 1993)；也有报道显示 APP 可能作为细胞表面蛋白

与 Aβ 相互作用参与了 Aβ 的细胞毒性作用（Lorenzo *et al*., 2000）。然而如何区分与调控 APP 的上述功能目前尚不明确，因而不同剂量的 APP/BACE 在泛神经元的表达是否通过不同的途径对果蝇寿命产生不同影响有待于进一步研究。同时，我们的研究发现 *APP/BACE/DPsn* 的过表达导致果蝇发育过程中致死率的提高，干扰果蝇胚胎的正常发育。寿命的缩短和早期胚胎发育延迟是我们获得的神经退行性疾病模型果蝇的重要表型特征，上述检测指标稳定，操作简单易行，因而有可能成为快速初步筛选 AD 治疗药物的指标，用于 AD 治疗药物的筛选。用免疫组化的方法检测 β-amyploid 斑块形成是更直观的 AD 模型证明。我们也曾经尝试在实验中用免疫组化法或 ELISA 检测果蝇脑中的 Aβ 生成，然而由于果蝇脑中 Aβ 斑块的沉积是渐进过程，而两拷贝果蝇的存活率随年龄的增加而减低，并且转基因果蝇脑中 Aβ 的含量极低，因而，尽管我们做了多次尝试，目前尚未获得可靠的实验结果，实验还在进一步优化中。

我们目前正在进一步运用已知的 AD 治疗药物在已建立的果蝇品系上进行疗效验证，这将有助于评价该果蝇品系是否可用于 AD 治疗药物的筛选，为寻找治疗 AD 的新药提供工具。

参 考 文 献（References）

Bilen J, Bonini NM, 2005. *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Genet*., 39: 153–171.

Brand AH, Perrimon N, 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2): 401–415.

Breen KC, Bruce M, Anderton BH, 1991. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J. Neurosci. Res*., 28: 90–100.

Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ, 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, 248(4959): 1122–1124.

Fortini ME, Bonini NM, 2000. Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. *Trends Genet*., 16(4): 161–167.

Greeve I, Kretzsch D, Tschäpe JA, Beyn A, Brellinger C, Schweizer M, Nitsch RM, Reifegerste R, 2004. Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *Neuroscience*, 24(16): 3899–3906.

Hardy J, Selkoe DJ, 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580): 353–356.

Iijima K, Chiang HC, Hearn SA, Hakker I, Gatt A, Shenton C, Granger L, Leung A, Iijima-Ando K, Zhong Y, 2008. Aβ42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 3(2): e1703.

Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y, 2004. Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 6623–6628.

Lorenzo A, Yuan ML, Zhang ZH, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA, 2000. Amyloid interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci*., 3(5): 460–464.

Lu BW, Vogel H, 2009. *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*., 4: 315–342.

Mattson MP, Cheng Bin, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE, 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β-amyloid precursor protein. *Neuron*, 10: 243–254.

Migliore L, Coppedè F, 2009. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat. Res*., 667(1–2): 82–97.

Milward EA Papadopoulos R, Fuller SJ, Moir D, Small D, Beyreuther K, Masters CL, 1992. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron*, 9: 129–137.

Reitz C, Brayne C, Mayeux R, 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol*., 7: 137–152.

Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Skchubert D, Ottersdorf T, Schenk DB, 1989. Secreted form of amyloid β protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*, 58: 615–622.

Schubert D, Behl C, 1993. The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from β-amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain Res*., 629: 275–282.

Selkoe DJ, 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev*., 81(2): 741–766.

Walsh DM, Selkoe DJ, 2007. Aβ oligomers – a decade of discovery. *Neurochem*., 101(5): 1172–1184.

Wan YQ, Xie W, 2006. *Drosophila*: an important model organism for understanding basic biological and human disease mechanisms. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 18(5): 425–429. [万永奇，谢维，2006. 生命科学与人类疾病研究的重要模型——果蝇. 生命科学，18(5)：425–429]

Wen A, Liu L, 2003. *Drosophila* as a model to study human neurodegenerative diseases. *Prog. Biochem. Biophys*., 30(3): 357–362. [温艾，刘力，2003. 以果蝇模型研究人类神经退行性疾病. 生物化学与生物物理进展，30(3):357–362]

Wu J, Wu T, Ding XS, 2006. The prospect to study AD using transgenic *Drosophila* model. *Stroke and Nervous Diseases*, 13(1): 56–58. [吴晋，吴婷，丁新生，2006. 以转基因果蝇为模型研究 AD 的前景. 卒中与神经疾病，13(1)：56–58]

Wu YS, 2008. Study Neurodegeneration in *Drosophila*: Identification of Mutants and Al^{3+}'s Role. MSc Thesis, Tsinghua University, Beijing. [武永生，2008. 用果蝇研究神经退行性疾病：突变体筛选和 Al^{3+} 的作用. 北京：清华大学硕士学位论文]

（责任编辑：赵利辉）